

Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas

M. Murillo¹, S. Espuelas¹, S. Prior², A. I. Vitas², M. J. Renedo¹, M. M. Goñi¹, J. M. Irache¹, C. Gamazo²

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica¹. Departamento de Microbiología². Universidad de Navarra

RESUMEN: Los principios activos incluidos en una forma galénica convencional se distribuyen indistintamente entre dianas biológicas específicas y otros tejidos anatómicos. Con el fin de obtener una terapéutica más racional y mejor adaptada, una de las posibilidades más prometedoras es la que utiliza el concepto de vectorización: asociación del principio activo a un vector apropiado, con objeto de aumentar la eficacia y la especificidad de acción del mismo. De esta manera, no solo aumenta la afinidad del fármaco por la diana, sino que además queda protegido de un ambiente potencialmente hostil (enzimas hidrolíticas, pH ácido, etc.). El éxito en la extensión de las aplicaciones de la vectorización depende cada vez más de un diseño adecuado, por lo que el objetivo fundamental de esta revisión será la de presentar las características generales y algunas de las actuales aplicaciones de estas nuevas formas farmacéuticas.

SUMMARY: Drugs inside a conventional galenic form are distributed between specific biological targets and other anatomical tissues. With the aim to obtain a more rational and a better therapeutic, one of the most promising possibilities by using the concept of vectorization: association of an active principle to an appropriate vector with the object to increase its action efficiency and efficacy. By this means, they do not just increase the affinity of the drug to the target but also active principle gets protected from a potentially hostile environment (hydrolytic enzymes, acid pH, etc.). The success in the extension of the applications of the vectorization depends more and more of an appropriate design, for what the fundamental objective of this revision will be the one of presenting the general characteristics and some of the current applications in these new galenic forms.

Palabras clave

Vectorización; Liposomas; Nanopartículas; Micropartículas.

Key words

Vectorization; Liposomes; Nanoparticles; Microparticles.

Correspondencia

Carlos Gamazo
Departamento de Microbiología
Universidad de Navarra
31080 Pamplona (Navarra)
Telefono: 948 425 688
Fax: 948 425 649
Email: cgamazo@unav.es

1. Vectorización de un principio activo

Se define la vectorización como la operación tecnológica dirigida a modular y, en el caso ideal, dirigir un principio activo en el organismo. En farmacología, se conoce como vector la forma farmacéutica que engloba al fármaco, de tal forma que es la estructura química del vector la responsable de las propiedades del conjunto "vector-principio activo". Así, las propiedades físico-químicas del vector (tamaño, carga, mecanismo de liberación, etc.) son las responsables de, por ejemplo: a) las propiedades farmacocinéticas del principio activo (distribución); b) mejorar el índice terapéutico, aumentando el efecto terapéutico y/o disminuyendo los efectos indeseables y la toxicidad que provoca el principio activo; c) aumentar la vida media del principio activo protegiendo a fármacos lábiles de su inactivación; d) modular la liberación del principio activo en el tiempo; e) aumentar la inmunogenicidad de antígenos encapsulados (1).

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Entre todas las ventajas atribuidas a la vectorización de fármacos podríamos destacar la especificidad de acción y la mejora en la penetración intracelular (2). La especificidad de acción permite dirigir el fármaco a las células o tejido diana de modo selectivo, evitando así determinados órganos y disminuyendo los efectos secundarios derivados de una distribución inespecífica. Por otro lado, la mejora en la penetración intracelular permite aumentar la eficacia de tratamientos que mediante formas convencionales no alcanzan concentraciones adecuadas a este nivel (3).

Por ejemplo, cuando la diana es el sistema monocito-macrofágico (para el tratamiento de infecciones en dicho sistema) al estar estas células especializadas en la captura de agentes extraños al organismo, la vectorización supondría la llave al compartimento intracelular (4).

Respecto a la naturaleza de los vectores, pueden ser biológicos y físico-químicos. Los vectores biológicos (eritrocitos, bacterias, virus, priones) presentan dos claros problemas, el primero es debido a que al ser material biológico va a existir una heterogeneidad en los lotes muy grande, el segundo es económico debido a las técnicas de confinamiento, de preparación, cumplimiento de normas, limpieza y formación de personal para llevarlos a cabo. Por ello, los vectores más prometedores y con gran potencial en la actualidad son los físico-químicos, que se pueden clasificar en generaciones: a la primera generación pertenecen las micropartículas; las nanopartículas y liposomas son de segunda generación, y de tercera generación los vectores pilotables, autopilotados, furtivos y de liberación específica. A continuación, se describen algunas de sus propiedades y aplicaciones clínicas.

2. Vectores físicos: definición y métodos de preparación

Los tres principales tipos de vectores físicos son liposomas, micropartículas y nanopartículas. Los liposomas difieren completamente en cuanto a su naturaleza y composición de los otros dos. La única diferencia entre las micropartículas y las nanopartículas hace referencia a su tamaño, superior o inferior a 1 μm , respectivamente.

2.1. Liposomas

Los liposomas son vesículas de membranas concéntricas compuestas por una o múltiples bicapas

fosfolípídicas, y que encierran un volumen acuoso en su interior. Se forman espontáneamente como resultado de las interacciones desfavorables lípido-agua.

Existen diversas técnicas para la preparación de liposomas que permiten obtener vesículas de distinta lamellaridad, tamaño, volumen interno y capacidad de encapsulación.

Los componentes estructurales más importantes son los fosfolípidos, y de éstos los más comunes las fosfatidilcolinas también conocidas como lecitinas. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que poseen una región hidrofílica (cabeza polar), compuesta por ácido fosfórico y una molécula de colina (en el caso de las fosfatidilcolinas), unida por una molécula de glicerol a una región hidrofóbica (cola apolar) formada por dos cadenas largas de ácidos grasos. Debido a las dos cadenas largas de ácidos grasos, la estructura que adoptan en contacto con el agua es de una capa bimolecular, y no micelar, y en su forma más estable, se repliegan formando estructuras cerradas, que encierran parte de la suspensión acuosa, los liposomas.

Además de fosfolípidos, otros compuestos pueden formar parte de la estructura de los liposomas, como es el caso del colesterol, que también es componente de la mayoría de membranas naturales, como componente estructural de los liposomas, el colesterol reduce la capacidad de movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos confiriendo rigidez a las vesículas lo que influye principalmente en su permeabilidad. Por otro lado, también se pueden incluir en la composición lipídica de los liposomas, moléculas que aporten cargas a la estructura como son el dipalmitoil-fosfatidil-glicerol, el diacetilfosfato, que confieren carga negativa; o la estearilamina, que confiere carga positiva a las vesículas.

Por último, la composición del liposoma le confiere cierto grado de fluidez que depende del grado de empaquetamiento de los lípidos, lo cual viene influenciado por la temperatura de transición T_g de estos. De esta T_g depende la estabilidad de las vesículas.

Según el número de bicapas lipídicas los liposomas se definen como vesículas unilamelares, grandes o pequeñas, o multilamelares, y se conocen como "large unilamellar vesicles" (LUVs), "small unilamellar vesicles" (SUVs), y "multilamellar vesicles" (MLVs), respectivamente.

En el caso de las SUVs y LUVs, la bicapa lipídica aloja una sola cavidad acuosa central y los tamaños

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

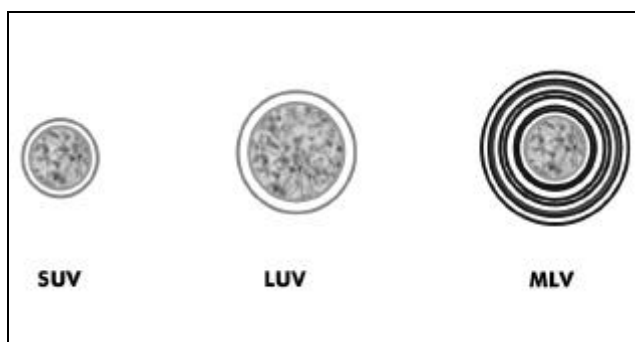
oscilan entre 25 y 50 nm para los SUVs y pueden alcanzar hasta varios cientos de nm para LUVs. Por otro lado, los MVLs encierran diferentes espacios acuosos entre las bicapas además de un espacio central, y están compuestos por poblaciones heterogeneas que oscilan entre las 0,4 μm y las 10 μm . Son los más sencillos de obtener, y generalmente de ellos se obtienen los unilamelares. De su estructura física se deriva su capacidad para encerrar mayores o menores volúmenes acuosos y presentar distintas eficacias de encapsulación. En la Figura 1, se pueden apreciar tipos de liposoma unilamelares.

2.1.1. Preparación de liposomas

Entre los principales métodos pueden citarse (5):

- Método de hidratación del film: Tras disolver los fosfolípidos y el resto de los componentes de la membrana en un disolvente orgánico volátil (cloroformo), se efectúa su evaporación a presión reducida para lograr la formación de una fina película sobre las paredes del recipiente de evaporación. La rehidratación de la película con una solución acuosa lleva a la formación de liposomas normalmente tipo MLV.
- Método de inyección rápida en etanol o éter: Los fosfolípidos disueltos en etanol o éter se inyectan a gran velocidad con ayuda de una jeringa sobre un gran volumen de fase acuosa. Se forman espontáneamente liposomas tipo SUV.
- Método de eliminación del detergente: La formación de liposomas unilamelares SUV se produce tras eliminar el detergente de una suspensión previamente preparada de micelas mixtas detergente/fosfolípidos.

Figura 1



Tipos de liposomas. El relleno en negrita representa espacio acuoso interior y los círculos concéntricos las bicapas lipídicas

- Método de evaporación en fase reversa: La adición de un pequeño volumen de fase acuosa sobre la solución orgánica con los fosfolípidos (relación 1:3) y posterior sonicación produce la formación de una emulsión. La eliminación de la fase orgánica a presión reducida induce la formación de liposomas a través de un estadio de gel intermedio. Esta técnica lleva a la obtención de liposomas LUV.

2.2. Micropartículas y nanopartículas

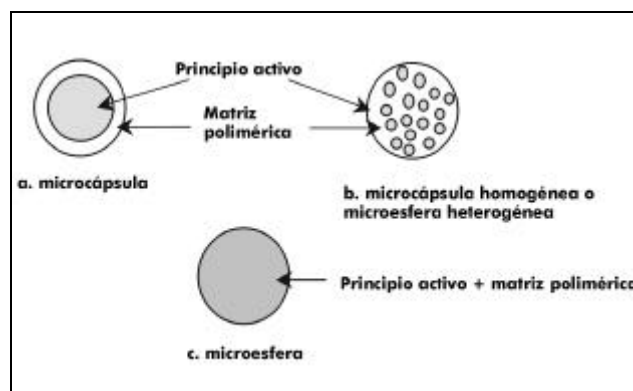
Las micro- y las nanopartículas comenzaron a elaborarse en los años 80, como alternativa a los liposomas, y con la idea de resolver los problemas de estabilidad que estos presentaban tras su administración en los fluidos biológicos y durante su almacenamiento.

Las micropartículas pueden definirse como partículas esféricas de origen polimérico cuyo tamaño se encuentra en el rango del micrómetro (1-250 μm). Las nanopartículas son sistemas sólidos coloidales, cuyo tamaño de partícula oscila entre 10 nm y 1 μm . En unas y otras, el principio activo se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado y/o adsorbido en el seno de la matriz que forma el vehículo portador o vector.

Según las técnicas de fabricación utilizadas y en función de su morfología, es posible distinguir tres categorías de micropartículas (6) (Figura 2):

- microcápsulas: partículas esféricas constituidas por un recubrimiento sólido que contiene en su interior una sustancia sólida, líquida o pastosa. Cada microcápsula constituye un sistema reservorio que da lugar a un estado de heterogeneidad máximo.

Figura 2



Tipos de micropartículas

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- **microesferas:** partículas esféricas constituidas por una red continua de material soporte o polimérico en el cual la sustancia a encapsular está dispersada al estado molecular (solución sólida) o al estado particular (dispersión sólida). Esta estructura, en estado de homogeneidad máximo, constituye un sistema matricial.
- **microcápsulas homogéneas** (formas multinucleares) o **microesferas heterogéneas** (dispersiones particulares): son sistemas intermedios entre los dos estados posibles de heterogeneidad (microcápsulas) y homogeneidad (microesferas). Se identifican por la presencia de zonas ricas y pobres en principio activo y por tener una estructura interna de tipo dispersión cristalina.

El proceso de asociación de un fármaco a este tipo de formas farmacéuticas se conoce como **microencapsulación**.

Paralelamente, podemos distinguir dos tipos principales de nanopartículas según el proceso de fabricación: así se pueden obtener **nanoesferas** de tipo matricial y **nanocápsulas** de tipo vesicular, formadas por un núcleo rodeado por una fina capa de material polimérico constitutivo (Figura 3).

Inicialmente, estos vectores se elaboraron con polímeros no biodegradables (poliacrilamida y polimetilmetacrilato), pero ante la imposibilidad de su administración en humanos por riesgo de acumulación y toxicidad crónica, se diseñaron y utilizaron polímeros biodegradables. Entre los materiales utilizados puede distinguirse los sintéticos, como polialquilcianoacrilatos, poliésteres (copolímeros del ácido láctico y glicólico, poli(e-caprolactona)), los derivados de macro-

moléculas naturales tipo protéico (gelatina, albúmina y colágeno), y los polisacáridos (ácido hialurónico, ácido alginico, quitosano).

Los poliésteres del tipo homo y copolímeros del ácido láctico y glicólico han sido ampliamente estudiados. Desde los años 70 aparecen trabajos publicados sobre su uso biomédico como material de suturas y prótesis, entre otros (7). Se trata de polímeros biocompatibles, biodegradables, probadamente seguros y además de gran versatilidad, que permiten el control del tiempo y velocidad de degradación en función de sus características físico-químicas como: masa molecular, estereoquímica y relación láctico/glicólico, principalmente.

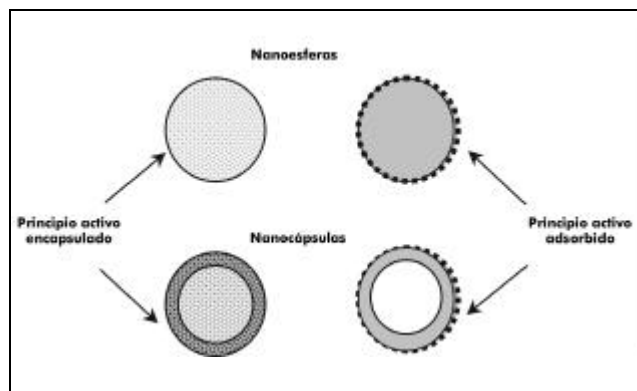
Se degradan por hidrólisis no enzimática de sus enlaces éster, aunque se ha sugerido un papel enzimático en la degradación del ácido láctico y glicólico a través del ciclo de Krebs (8, 9). Se pueden encontrar comercialmente con la calidad adecuada para aplicaciones terapéuticas y están aprobados por la FDA para su uso como vectores para administración parenteral.

2.2.1. Preparación de micropartículas

Los procedimientos de fabricación de micropartículas se pueden clasificar en tres grandes grupos: físico-químicos, químicos y mecánicos. La selección de un procedimiento de fabricación de micropartículas depende de las propiedades físicas y químicas de la pareja principio activo / polímero, y de las características finales de las micropartículas a preparar (granulometría, estructura interna, concentración del principio activo, perfil de liberación, humectabilidad, etc.), en función, principalmente, de la vía de administración elegida.

Los métodos de preparación más utilizados son la "evaporación/extracción del disolvente" y el denominado "spray-drying". Generalmente, y como paso común para estos métodos, el fármaco a encapsular disuelto en solución acuosa o como polvo seco, se dispersa en la solución orgánica que contiene el polímero (inmiscible con la fase acuosa), mediante un homogeneizador o sonicador. De esta manera se forma o bien una emulsión del tipo hidrófilo en lipófilo (H/L) o bien el fármaco queda disperso en la solución polimérica. En el primero de los métodos, evaporación del disolvente, la fase orgánica o la emulsión se vierte sobre una fase acuosa con tensioactivo y tras agitación continua que permite la evaporación del disolvente se obtienen las micropartículas.

Figura 3



Tipos de nanopartículas

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

En el segundo método, "spray-drying", ventajoso para la producción a gran escala, se nebuliza la solución polimérica o la emulsión bajo una corriente de aire caliente que permite la evaporación del disolvente y la formación de las partículas es instantánea.

2.2.2. Preparación de nanopartículas

Los procesos de preparación se pueden dividir en dos categorías principales:

- Métodos basados en la polimerización de monómeros en un medio en que el polímero resultante es insoluble. La formación de las nanopartículas tiene lugar por la adición de un agente inductor de la polimerización que produce la formación de pequeños núcleos de oligómeros que tras una fase de crecimiento precipitan formando las partículas. El monómero puede ser soluble en el medio de la reacción (dispersión-polimerización) o formar en él un sistema bifásico (emulsión-polimerización y polimerización micelar).
- Métodos basados en la precipitación a partir de macromoléculas o polímeros preformados. Se trata de inducir la precipitación de las macromoléculas al modificar las características físico-químicas del medio en que se encuentran inicialmente disueltas. La selección del método de preparación dependerá fundamentalmente de las propiedades físico-químicas del fármaco.

3. Aplicaciones Terapéuticas

Las posibles aplicaciones terapéuticas de los vectores coloidales son consecuencia de su distribución en el organismo (10, 11).

Cuando son administrados por vía intravenosa, si se trata de vehículos convencionales, con naturaleza hidrofóbica de superficie, son opsonizados por las proteínas plasmáticas, sobre todo por factores del complemento, y son entonces capturados por las células del sistema monocito-macrofágico. Además, serán extravasados en aquellos tejidos con endotelio capilar discontinuo (hígado, bazo y médula ósea) o defectivo, como en tejidos inflamados o infectados. Esta distribución es la que posibilita su utilización para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias del sistema mononuclear fagocítico (12). Así, por ejemplo, nanopartículas encapsulando ampicilina mejoraron la eficacia del antibiótico frente a *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Una formulación liposomal de amikacina (Mikosome®) está actualmente en

ensayos clínicos en los casos de infecciones bacterianas complicadas.

Por otro lado, la alta nefrotoxicidad del potente antifúngico anfotericina B disminuyó cuando se administró en formulaciones de liposomas (13), nanopartículas (14) o microemulsiones; y de hecho, tres preparaciones de naturaleza lipídica ya han sido comercializadas (AmBisome®, Albecet® y Amphocil®) (15). La disminución de la toxicidad parece resultado de una biodistribución alterada, pero también del estado de agregación del fármaco en estos vectores. La asociación del fármaco con los lípidos o con los polímeros mantiene al fármaco en su forma monomérica, que no es capaz de dañar las células propias, mientras que mantiene su actividad frente a las células fúngicas. Sin embargo, esta disminución de la toxicidad de la AmB en los vectores está asociada con una reducción general en su eficacia para el tratamiento de infecciones fúngicas. Por el contrario, tanto nanopartículas como liposomas consiguen mejorar la eficacia del antibiótico para el tratamiento de la leishmaniasis, infección parasitaria que se localiza de forma exclusiva en los macrófagos. En la Tabla I (14, 16-51) se resumen las aplicaciones de los vectores en terapia antimicrobiana.

La rápida captura de los vectores coloidales por los macrófagos tras su administración intravenosa ha sido también explotada para la liberación de citoquinas (52) (IFN- γ , IL-2 y G-CSF), de otros productos inmunoestimulantes (muramildipéptido) y de antígenos. Los beneficios derivan no sólo del hecho de que los vectores protegen a materiales de naturaleza proteica de la degradación sino también porque actúan como adyuvantes. En este sentido, el gran potencial de los liposomas como adyuvantes inmunológicos (53) comenzó ya a evidenciarse a partir de los años 70. Se está estudiando ampliamente la aplicación de la utilización de citoquinas en liposomas como sistemas adyuvantes para vacunación en el tratamiento de tumores, así como para modular la respuesta T en enfermedades autoinmunes. Un adyuvante es cualquier sustancia que incrementa la respuesta inmune a un antígeno con el que se mezcla. Los adyuvantes actúan fundamentalmente mediante tres mecanismos: 1) formando un depósito de antígeno en el lugar de aplicación de la vacuna, a partir del cual se va liberando el antígeno durante un periodo de tiempo variable; 2) suministrando el antígeno a las células presentadoras de antígeno; y 3) induciendo la secre-

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

ción de interleuquinas. La explotación de las vacunas de nueva generación, que incluyen las vacunas subcelulares (complejos de membrana, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, DNA, etc), está siendo limitada debido principalmente a su deficiente inmunogenicidad y a la carencia de adyuvantes apropiados, como podrían ser estos vectores. La utilización de los liposomas como vehículo de antígenos gracias a su poder adyuvante y a su captación por células presentadoras de antígeno (54-56) ha llevado ya a la comercialización de vacunas basadas en liposomas, así encontramos,

- Novasomes® vacunas con: 1) el virus inactivado de la enfermedad de Newcastle, 2) Reovirus Aviar inactivado, 3) *E. coli* 0157: H7 inactivado y 4) *Shigella flexneri* inactivada
- Epaxal-Berna® preparados a base de liposomas IRIV "immunostimulating reconstituted influenza virosomes": 1) virus de la Hepatitis A inactivado, 2) la hemaglutinina y neuraminidasa trivalente del virus Influenza (Singapore 6/86; Beijing 353/89; Yamagata 16/88), 3) antígeno recombinante de superficie del virus de la Hepatitis B y el virus de la Hepatitis A inactivado, 4) virus de la Hepatitis A inactivado junto con los toxoides del Tétanos y la

Difteria y 5) virus de la Hepatitis A y B inactivados, virus Influenza inactivado además de los toxoides del Tétanos y la Difteria.

La rápida eliminación de los vectores submicrónicos convencionales por el hígado y el bazo, posibilita su aplicación en el tratamiento de infecciones microbianas, lo que representa un problema cuando se quieren tratar afecciones de otros órganos. Esto llevó al desarrollo de liposomas con periodo de circulación más largo (llamados liposomas "furtivos" o "estabilizados estéricamente"), que permitía su acceso a otros lugares del organismo (57, 58).

En este sentido, los vectores han proporcionado buenos resultados en su utilización con agentes anticancerosos (Tabla II; refs: 59-90), porque disminuyen la toxicidad sistémica junto con una mejora en su eficacia. Por ejemplo, la doxorubicina es activa contra un espectro amplio de tumores pero su dosis se ve limitada por su elevada cardiotoxicidad. Su asociación con liposomas o nanopartículas disminuye su toxicidad al reducirse su concentración a nivel del miocardio. De hecho, formulaciones liposomales de doxorubicina y daunorubicina ya han sido comercializadas (DaunoXone®, Caelyx® y DOX-SL®). La forma mas utilizada hasta la fecha para producir lipo-

Tabla I

Terapia Antimicrobiana

	Micropartículas	Liposomas	Nanopartículas
Anti-protozoarios	Gluconato (16) Pirimetamina (17)	Antimonio (18) Amarogentina, (19) Primaquine (20) Cloroquina (21)	Pentamidina (22) Metoxichalcona (23)
Antibacterianos	Gentamicina (24) Ampicilina (25) Cefazolina (26) Amoxicilina (27) Ampicilina+Amoxicilina(28)	Gentamicina (29, 30,31) Estreptomycin (32) Rifabutina (33) Clotrimazol (34) Ampicilina (35) Ciprofloxacina (36)	Ampicilina (37, 38)
Antivirales	Ganciclovir (39) Aciclovir (40)	Aciclovir (41, 42) Ganciclovir (43)	Ganciclovir (44) Oligonucleótidos (45)
Antifungicos	Ciclosporina (46,47) Pentamidina (48)	AmB (49, 50)	AmB (51, 14)

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Tabla II

Quimioterapia, Terapia hormonal y enzimoterapia

Micropartículas	Liposomas	Nanopartículas
Doxorrubicina (59)	Ara-C (63)	Ciclosporina A+ Doxorrubicina (68)
5-Fluorouracilo (60, 61)	Doxorrubicina (64, 65, 66)	Doxorrubicina (69)
Bleomicina (62)	5-Fluoracilo (67)	Glucocorticoides (79)
Glucagon (70)	Estradiol (76)	Calcitonina (80)
Progesterona (71)	Calcitonina (77)	Progesterona (81)
HLRH (72)	Hormona melanocítica (78)	Factor crecimiento vascular endotelial (82)
Leuproterina (73, 74)		Insulina (87,88)
Corticoesteroides (75)		
Insulina (83, 84)	Insulina (85, 86)	
	Lisozima (89)	
	Superóxido dismutasa (90)	

somas o nanopartículas de largo tiempo de circulación ha sido mediante la asociación con polímeros de naturaleza hidrofílica, como el polietilenglicol.

Micropartículas conteniendo antineoplásicos también han sido comercializados para su administración subcutánea o intramuscular. Entre ellos podemos citar: Sumaturina®, Decapeptyl®, Procrin®, Ginecrin®, Enantone®, Zoladex Depot®, Sandimmun® y Parlodel LAR®. La administración intramuscular o subcutánea de micropartículas tiene por objetivo el formar un reservorio o depósito de medicamento en el lugar de administración desde el cual, el principio activo encapsulado se vaya liberando de manera controlada. En esa zona el soporte polimérico se va degradando lentamente y liberando por difusión y erosión el fármaco encapsulado. La velocidad de degradación del sistema depende de su forma, tamaño y del material utilizado (59-90).

Por otro lado, la capacidad de liposomas, micro- y nanopartículas de proteger los fármacos frente a degradación rápida, así como de incrementar la difusión de algunos de ellos a través de ciertas barreras biológicas se han aprovechado para permitir su administración por vía oral (91). Así, nanocápsulas de polialquilcianoacrilatos fueron efectivas para proteger a la insulina (92) y un análogo de la somatostatina de su degradación enzimática en el tracto gastrointestinal, y protegieron a la mucosa gástrica de las ulceraciones que produce la ingesta de AINES (como indometacina). Además, el uso de nanopartículas con propiedades bioadhesivas podrían mejorar la absorción de fármacos poco hidrosolubles.

También, la utilización de vectores ha permitido proteger a los antígenos de su degradación en el tracto gastrointestinal, posibilitando la inmunización oral por su entrada y liberación en la placas de Peyer (93). Las ventajas de la microencapsulación de antígenos para lograr inmunización en mucosas, no solamente oral, sino también nasal, pulmonar u ocular (Tabla III; refs: 95-125) están siendo extensamente estudiados (94). Parece que la administración mucosal de micropartículas para inmunización confiere un nivel más alto de protección comparada a su administración parenteral (subcutánea o intramuscular) ya que la mayoría de las bacterias y virus acceden al huésped a través de mucosas y de esta forma el lugar de inmunización es paralelo al de infección (95-125).

Finalmente, estos vectores se están estudiando como sistemas de liberación y protección de material genético (126, 127). Si bien en terapia génica los vectores virales han sido más estudiados hasta la fecha, su uso está limitado por la inmunogenicidad del vector en si mismo, así como en algunos casos limitada capacidad de empaquetamiento de DNA. Los vectores sintéticos tienen una menor eficacia de transfección.

Finalmente, estos vectores se están estudiando como sistemas de liberación y protección de material genético (126, 127). Si bien en terapia génica los vectores virales han sido más estudiados hasta la fecha, su uso está limitado por la inmunogenicidad del vector en si mismo, así como en algunos casos limitada capacidad de empaquetamiento de DNA. Los vectores sintéticos tienen una menor eficacia de transfección.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Tabla III

Inmunoprofilaxis

Micropartículas

Bordetella pertussis, fimbrias (95)
Bordetella pertussis, toxoide (96)
Clostridium tetani, toxoide (TT) (97)
Corynebacterium diphtheriae, toxoide (DT) (98)
Escherichia coli, fimbrias (100)
E. coli, antígeno Factor de colonización (99)
Clostridium tetani, toxoide (TT) +
Corynebacterium diphtheriae, toxoide (DT) (101)
Mycobacterium tuberculosis, antígenos (102)
Staphylococcus aureus, enterotoxina B (103)
Vibrio cholerae, toxina subunidad B (104)
Yersinia pestis, antígeno F1 (105)

Virus Hepatitis B, antígeno de superficie (106)
Virus Influenza: HA/NA, antígeno M1 (107)
Virus Influenza tipo A: H3N3 (108)
VIS, subunidades antigénicas (109)
VIH, subunidades antigénicas (110)
Virus Parainfluenza Humano, tipo 3 (111)x
Virus de la Parotiditis (112)
Virus de la Rabia, nucleoproteína (113)
Virus Respiratorio Sincitial (114)

Plasmodium, subunidades antigénicas (115)

Liposomas

Actinobacillus actinomycetemcomitans, fimbrias (116)
Toxoplasma gondii, antígeno (117)
Virus Hepatitis A, antígeno de superficie (118)
Virus Hepatitis A, péptido sintético (119)
Virus Hepatitis A, epitopo (120)
Virus diarrea Bovina, plásmido (121)

Nanopartículas

Helicobacter pylori (122)
Virus Influenza, glicoproteínas (123)
HER2-expressing murine sarcomas (124)
HIV-1MN gp120 (125)

ción, pero ofrecen otras ventajas como su inocuidad, mayor facilidad de producción, estabilidad y almacenamiento, así como versatilidad en cuanto a "targeting" específico. Así, se ha descrito que nanopartículas de polialquilcianoacrilatos protegen a oligonucleótidos (Tabla I) de su rápida degradación en medios biológicos y favorecen la penetración intracelular (128, 129); nanopartículas de albúmina protegieron eficazmente al oligonucleótido ISIS 2922, y están siendo ampliamente estudiadas como vectores de DNA para vacunación oral. Los liposomas de carga positiva, se han mostrado los más eficaces porque neutralizan la carga negativa del DNA, dándole una estructura más compacta, hecho que parece promover la internalización y expresión del material genético (130).

Otras aplicaciones se muestran en la Tabla IV (4, 131-151).

4. Perspectivas futuras

Como ya se ha señalado, el desarrollo y la obtención de vectores con un mayor tiempo de circulación y que no fueran rápidamente capturados por las células del sistema monocito-macrofágico, constituyeron un importante avance que amplió sus aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para la liberación selectiva de anticancerosos (Doxil®, DaunoXome®) (11). Hasta la fecha, la forma habitual de preparar estos liposomas o nanopartículas "furtivas" ha sido mediante la unión covalente de polímeros hidrofílicos a la superficie, como polietilenglicol (PEG). Actualmente, se investigan otras estrategias para preparar estos vectores de larga circulación, que imitan los métodos utilizados por los patógenos o las células para evadir a los macrófagos (llamadas por ello biomiméticas): así se está intentando la preparación de liposomas con una composición de membrana

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Tabla IV

Otras aplicaciones terapéuticas

Micropartículas	Liposomas	Nanopartículas
Diclofenaco sódico (131)	Artritis (clodronato) (137)	Bioadhesión (142)
Ibuprofeno (132)	Agentes quelantes (138)	Diagnóstico (143-145)
Ketoprofeno (133)	Citoquinas (139)	Terapia Génica (146)
Captopril (134)	Ketoprofen (140)	Clonazepam (147)
Clonazepam (135)	Diclofenaco (141)	Vitaminas (148)
Diazepam (136)		Alopurinol (149)
		Indometacina (150)
		Ketoprofeno (151)

similar a la de los eritrocitos, con ácidos polisialícos o con GM₁, así como el recubrimiento de nanoesferas de polimetilmetacrilato con heparina, polisacárido conocido por inhibir la activación del complemento (10).

Otra limitación importante de estos vectores, sobre todo en el caso de que actúen como portadores de genes u oligonucleótidos, la constituye el hecho de que son normalmente capturados por endocitosis y por tanto, acaban sufriendo degradación hidrolítica en los lisosomas. Por ello, se han realizado esfuerzos para la elaboración de vectores que eviten el compartimiento lisosomal, mediante la incorporación de péptidos fusogénicos o mediante la preparación de liposomas, pH sensibles, capaces de desestabilizar los endosomas. De esta forma se consigue que el material encapsulado sea liberado en el citoplasma. En el caso de los antígenos, además, la forma de internalización determina el tipo de expresión en su superficie, y con ello, se podría modular el tipo de respuesta inmune (Th₁ o Th₂).

Finalmente, otro objetivo deseado es la preparación de vectores con especificidad celular ("immunotargeting") mediante la unión covalente en su superficie de ciertos ligandos específicos, como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos, azúcares, lectinas, factores de crecimiento, o nutrientes celulares para los que sobreexpresan receptores ciertos tipos celulares particulares. Por ejemplo, se podrían dirigir de forma selectiva a los hepatocitos aprovechando que sobreexpresan receptores para la galactosa, o hacia algunos tumores que sobreexpresan receptores para la transferrina o el ácido fólico. Desafortunadamente, aunque los resultados conseguidos in vitro han sido sorprendentes, no ha ocurrido lo mismo in vivo (10, 130).

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda económica prestada por "Proyectos de Investigación Universidad de Navarra" (PIUNA) y M. Murillo agradece la beca predoctoral concedida por el Gobierno de Navarra.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

BIBLIOGRAFÍA

1. Couvreur P, Puisieux F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv Drug Delivery Rev* 1993; 10: 141-162.
2. Puisieux F, Barrat G, Couarraze G, et al. Polymeric micro- and nanoparticles as drug carriers. En: Dumitriu S, ed. *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994; 749-794.
3. Allémann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles, preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J Pharm Biopharm* 1993; 39: 173-191.
4. Kreuter J. Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. *Infection* 1991; 19. Suppl 4: S224-8.
5. New RRC. *Liposomes: a practical approach*. Liverpool, UK: Oxford University Press, 1989. (Rickwood D, Hames, B. D., ed. *The Practical approach series*).
6. Benoit JP, Marchais H, Rolland H, Velde V. V. Biodegradable microspheres: advances in production technology. En: Benita S, ed. *Microencapsulation methods and industrial applications*, vol 73. New York: Marcel Dekker, 1996; 35-71.
7. Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. En: Chasin MaL, R., ed. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. USA, 1990; 1-42.
8. Williams DF, Mort E. Enzyme-accelerated hydrolysis of polyglycolic acid. *J Bioengineering* 1977; 1: 231-238.
9. Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J Controlled Rel* 1986; 4: 155-180.
10. Barratt G. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Tech. Today* 2000; 3: 163-171.
11. Lasic DD, Papahadjopoulos, D. *Medical applications of liposomes*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998. (Lasic DD, Papahadjopoulos, D., ed.).
12. Pinto-Alphandary H, Andre-mont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13: 1155-168.
13. Brajtburg J, Bolard, J. Carriers effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 512- 531.
14. Espuelas MS, Legrand, P, Irache, JM, Gamazo, C, Orecchioni, AM, Devissaguet, JPh, Ygartua, P. Poly(ϵ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. *Int J Pharm* 1997; 158: 19-27.
15. Hillery AM. Supramolecular lipidic drug delivery systems: From laboratory to clinic. A review of the recently introduced commercial liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Adv Drug Del Rev* 1997; 24: 345-363.
16. Baillie AJ, Coombs GH, Dolan TF, et al. Biodegradable microspheres: polyacryl starch microparticles as a delivery system for the antileishmanial drug, sodium stibogluconate. *J Pharm Pharmacol* 1987; 39: 832-835.
17. Tsakala M, Gillet J, Gillard J. [New antimalarial sustained-release formulations based on bioresorbable polymers: therapeutic evaluation using the *Plasmodium berghei* model]. *J Pharm Belg* 1990; 45: 5-11.
18. Frezard F, Michalick, M. S., Soares, C. F., Demicheli, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 841-846.
19. Medda S, Mukhopadhyay S, Basu MK. Evaluation of the in-vivo activity and toxicity of amphotericin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 791-794.
20. Stensrud G, Sande SA, Kristensen S, Smistad G. Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design. *Int J Pharm* 2000; 198: 213-222.
21. Owais M, Varshney GC, Choudhury A, Chandra S, Gupta CM. Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 180-184.
22. Paul M, Durand R, Boulard Y, et al. Physicochemical characteristics of pentamidine-loaded polymethacrylate nanoparticles: implication in the intracellular drug release in *Leishmania major* infected mice. *J Drug Target* 1998; 5: 481-490.
23. Torres-Santos EC, Rodrigues JMJ, Moreira DL, Kaplan MA, Rossi-Bergmann B. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1776-1778.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

24. Prior S, Gamazo C, Irache JM, Merkle HP, Gander B. Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections. *Int J Pharm* 2000; 196: 115-125.

25. Giunchedi P, Genta I, Conti B, Muzzarelli RA, Conte U. Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres. *Biomaterials* 1998; 19: 157-161.

26. Fallon MT, Shafer W, Jacob E. Use of cefazolin microspheres to treat localized methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in rats. *J Surg Res* 1999; 86: 97-102.

27. Nagahara N, Akiyama Y, Nakao M, et al. Mucoadhesive microspheres containing amoxicillin for clearance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; 42: 2492-2494.

28. Ertan G, Sarigüllü I, Karasulu Y, Kantarci G, Asikoglu M. A new microcapsule from ampicillin and amoxycillin. *Proc. 9th Int. Symp. on Microencapsulation*, Ankara, Turkey, 1993.

29. Cordeiro C, Wiseman DJ, Lutwyche P, et al. Antibacterial efficacy of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes against an in vivo *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* intracellular infection model. *Agents Chemother* 2000; 44: 533-539.

30. Cabanes A, Reig F, Garcia-Anton JM, Arboix M. Evaluation of free and liposome-encapsulated gentamicin for intramuscular sustained release in rabbits. *Res Vet Sci* 1998; 64: 213-217.

31. Vitas AI, Diaz R, Gamazo C. Protective effect of liposomal gentamicin against systemic acute murine brucellosis. *Chemotherapy* 1997; 43: 204-210.

32. Khalil RM, Murad FE, Yehia SA, El-Ridy MS, Salama HA. Free versus liposome-entrapped streptomycin sulfate in treatment of infections caused by *Salmonella enteritidis*. *Pharmazie* 1996; 51: 182-184.

33. Gaspar MM, Neves S, Portaels F, et al. Therapeutic efficacy of liposomal rifabutin in a *Mycobacterium avium* model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2424-2430.

34. Adams LB, Sinha I, Franzblau SG, Krahenbuhl JL, Mehta RT. Effective treatment of acute and chronic murine tuberculosis with liposome-encapsulated clofazimine. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1638-1643.

35. Schumacher I, Margalit R. Liposome-encapsulated ampicillin: physicochemical and antibacterial properties. *J Pharm Sci* 1997; 86: 635-641.

36. Wong JP, Schnell G, Simpson M, Saravolac E. Effects of liposome-encapsulated ciprofloxacin on phagocytosis, nitric oxide and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by murine macrophages. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; 28: 415-428.

37. Fontana G, Pitarresi G, Tomarchio V, Carlisi B, San Biagio PL. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 1998; 19: 1009-1017.

38. Balland O, Pinto-Alphandary H, Viron A, et al. Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H)ampicillin-loaded nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 105-115.

39. Veloso AA, Zhu Q, Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Ganciclovir-

loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 665-675.

40. Genta I, Conti B, Perugini P, et al. Bioadhesive microspheres ophthalmic delivery of acyclovir. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 737-742.

41. Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, Lehr CM. A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug Chem* 2000; 11: 926-932.

42. Fresta M, Panico AM, Bucolo C, Giannavola C, Puglisi G. Characterization and in-vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 565-576.

43. Cheng L, Hostetler KY, Chaidhawangul S, et al. Intravitreal toxicology and duration of efficacy of a novel antiviral lipid prodrug of ganciclovir in liposome formulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1523-1532.

44. Merodio M, Arnedo A, Renedo MJ, Irache JM. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12: 251-259.

45. Zimmer A. Antisense oligonucleotide delivery with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers. *Methods* 1999; 18: 286-95, 322.

46. Chacon M, Molpeceres J, Berges L, Guzman M, Aberturas MR. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8: 99-107.

47. Urata T, Arimori K, Nakano H. Modification of release rates of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) microspheres by fatty acid esters and

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

in-vivo evaluation of the microspheres. *J Control Release* 1999; 58: 133-141.

48. Mandal TK. Effect of solvent on the characteristics of pentamidine loaded microcapsule. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999; 10: 1-17.

49. Chakraborty KK, Naik SR. In situ liposomal preparation containing amphotericin B: related toxicity and tissue disposition studies. *Pharm Dev Technol* 2000; 5: 543-553.

50. González E, Rada MA, Lumbieras C, Ramos JT, Aguado JM. [Safety of liposomal amphotericin B in patients with high risk of nephrotoxicity]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 162-164.

51. Sen N, Samanta A, Baidya S, Gupta BK, Ghosh LK. Development of amphotericin B loaded nanoparticles. *Boll Chim Farm* 1998; 137: 295-297.

52. Van Slooten ML, Boerman O, Romoren K, Kedar E, Crommelin DJA, Storm G. Liposomes as sustained release system for human interferon- γ : biopharmaceutical aspects. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1530: 134-145.

53. Gregoriadis G. The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes. *J Drug Target* 1994; 2: 351-356.

54. Pisarev VM, Parajuli P, Mosley RL, et al. Flt3 ligand enhances the immunogenicity of a gag-based HIV-1 vaccine. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 865-876.

55. Plum SM, Holaday JW, Ruiz A, et al. Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. *Vaccine* 2000; 19: 1294-1303.

56. Ignatius R, Mahnke K, Rivera M, et al. Presentation of proteins en-

capsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood* 2000; 96: 3505-3513.

57. Gregoriadis G, McCormack, B. Targeting of Drugs 6: Strategies for Stealth Therapeutic systems: Plenum Press, 1998.

58. Allen TM, Hansen CB, Lopes de Menezes DE. Pharmacokinetics of long circulating liposomes. *Adv Drug Del Rev* 1995; 16: 267-284.

59. Mallery SR, Pei P, Kang J, et al. Controlled-release of doxorubicin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres significantly enhances cytotoxicity against cultured AIDS-related Kaposi's sarcoma cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 2817-2825.

60. Martini LG, Collett JH, Attwood D: The release of 5-fluorouracil from microspheres of poly (e-caprolactone-co-ethylene oxide). *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26: 7-12.

61. Chandy T, Das GS, Rao GH: 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *J Microencapsulation* 2000; 17: 625-638.

62. Lin SY. Influence of coacervation-inducing agents and cooling rates on the preparation and in vitro release of bleomycin HCl microcapsules. *J Microencapsulation* 1985; 2: 91-95.

63. Cortesi R, Gui V, Gambari R, Nastruzzi C. In vitro effect on human leukemic K562 cells of co-administration of liposome-associated retinoids and cytosine arabinoside (Ara-C). *Am J Hematol* 1999; 62: 33-43.

64. Lotem M, Hubert A, Lyass O, et al. Skin toxic effects of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1475-1480.

65. Junping W, Maitani Y, Takayama K, Nagai T. In vivo evaluation of doxorubicin carried with long circulating and remote loading proliposome. *Int J Pharm* 2000; 203: 61-69.

66. Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, et al. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1037-1047.

67. Namdeo A, Jain NK. Niosomal delivery of 5-fluorouracil. *J Microencapsulation* 1999; 16: 731-740.

68. Soma CE, Dubernet C, Bentolila D, Benita S, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 2000; 21: 1-7.

69. Yoo HS, Lee KH, Oh JE, Park TG. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J Control Rel* 2000; 68: 419-431.

70. Joseph JW, Kalitsky J, St-Pierre S, Brubaker PL. Oral delivery of glucagon-like peptide-1 in a modified polymer preparation normalizes basal glycaemia in diabetic db/db mice. *Diabetologia* 2000; 43: 1319-1328.

71. Latha MS, Lal AV, Kumary TV, Sreekumar R, Jayakrishnan A. Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: in vitro studies and in vivo response in rabbits. *Contraception* 2000; 61: 329-334.

72. Kostanski JW, Dani BA, Schrier B, DeLuca PP. Effect of the concurrent LHRH antagonist administration with a LHRH superagonist in rats. *Pharm Res* 2000; 17: 445-450.

73. Anderson MG, Miller JD. Therapeutic effects of leuporelin micros-

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

pheres on endometriosis and uterine leiomyomata. *Adv Drug Del Rev* 1997; 28: 139-155.

74. Lee M, Browneller R, Wu Z, et al. Therapeutic effects of leuporelin microspheres in prostate cancer. *Adv Drug Del Rev* 1997; 28: 121-138.

75. Jeyanthi R, Mehta RC, Thanoo BC, DeLuca PP. Effect of processing parameters on the properties of peptide-containing PLGA microspheres. *J Microencapsulation* 1997; 14: 163-174.

76. Jain PT, Seth P, Gewirtz DA. Estradiol enhances liposomes-mediated uptake, preferential nuclear accumulation and functional expression of exogenous genes in MDA-MB231 breast tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1451: 224-232.

77. Arien A, Dupuy B. Encapsulation of calcitonin in liposomes depends on the vesicle preparation method. *J Microencapsulation* 1997; 14: 753-760.

78. Ogawa Y, Kawahara H, Yagi N, et al. Synthesis of a novel lipopeptide with alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide ligand and its effect on liposome stability. *Lipids* 1986; 34: 387-394.

79. Maia CS, Mehnert W, Schafer-Korting M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *Int J Pharm* 2000; 196: 165-167.

80. Lowe PJ, Temple CS. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 547-552.

81. Li VH, Wood RW, Kreuter J, Harmia T, Robinson JR. Ocular delivery of progesterone using nanoparticles. *J Microencapsulation* 1986; 3: 213-218.

82. Monsky WL, Fukumura D, Gohongi T, et al. Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 1999; 59: 4129-4135.

83. Hu YQ, Guo JX, Wang LJ, Tan R, Zhen LY. Preparation and evaluation of insulin-loaded polylactide microspheres using factorial design. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26: 1309-1313.

84. De Rosa GD, Iommelli R, La Rotonda MI, Miro A, Quaglia F. Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres. *J Control Rel* 2000; 69: 283-295.

85. Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Systemic administration of HVJ viral coat-liposome complex containing human insulin vector decreases glucose level in diabetic mouse: A model of gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 666-674.

86. Hwang SH, Maitani Y, Takayama K, Nagai T. High entrapment of insulin and bovine serum albumin into neutral and positively-charged liposomes by the remote loading method. *Chem Pharm Bull* 2000; 48: 325-329.

87. Cherian AK, Dana AC, Jain SK. Self-assembled carbohydrate-stabilized ceramic nanoparticles for the parenteral delivery of insulin. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26: 459-463.

88. Fernández-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm Res* 1999; 16: 1576-1581.

89. Roslaniec M, Weitman H, Freeman D, Mazur Y, Ehrenberg B.

Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthone and their derivatives: studies in organic solutions and in liposomes. *J Photochem Photobiol B* 2000; 57: 149-158.

90. Epperly MW, Sikora C, Defilippi S, et al. Plasmid/liposome transfer of the human manganese superoxide dismutase transgene prevents ionizing irradiation-induced apoptosis in human esophagus organ explant culture. *Int J Cancer* 2000; 90: 128-137.

91. Devissaguet J-P. Colloidal Drug Delivery systems for gastrointestinal applications. En: Junginger HE, ed. *Drug Targeting and Delivery: Concepts in Dosage Form Design*: Ellis Horwood Ltd., 1992; 71-91.

92. Damgé C, Vranckx H, Balschmidt P, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1403-1409.

93. Powell MF. Drug delivery issues in vaccine development. *Pharm Res* 1996; 13: 1777-1785.

94. Johansen P, Men Y, Merckle HP, Gander B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 129-146.

95. Jones DH, McBride BW, Thornton C, et al. Orally administered microencapsulated Bordetella pertussis fimbriae protect mice from *B. pertussis* respiratory infection. *Infect Immun* 1996; 64: 489-494.

96. Shahin R, Leef M, Eldridge J, Hudson M, Gilley R. Adjuvancy and protective immunity elicited by *Bordetella pertussis* antigens encapsulated in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect Immun* 1995; 63: 1195-1200.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

97. Singh M, Li XM, Wang H, et al. Immunogenicity and protection in small-animal models with controlled-release tetanus toxoid microparticles as a single-dose vaccine. *Infect Immun* 1997; 65: 1716-1721.

98. Johansen P, Moon L, Tamber H, et al. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. *Vaccine* 1999; 18: 209-215.

99. Edelman JE, Russell RG, Losonsky G, et al. Immunization of rabbits with enterotoxigenic *E. coli* colonization factor antigen (CFA/I) encapsulated in biodegradable microspheres of poly (lactide-co-glycolide). *Vaccine* 1993; 11: 155-158.

100. Felder CB, Vorlaender N, Gander B, Merkle HP, Bertschinger HU. Microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* and detached fimbriae for peroral vaccination of pigs. *Vaccine* 2000; 19: 706-715.

101. Gupta RK, Griffin PJ, Rivera R, Siber GR. Development of an animal model to assess the immunogenicity of single-dose tetanus and diphtheria vaccines based on controlled release from biodegradable polymer microspheres. *Dev Biol Stand* 1998; 92: 277-287.

102. Venkataprasad N, Coombes AG, Singh M, et al. Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers. *Vaccine* 1999; 17: 1814-1819.

103. Tseng J, Komisar JL, Trout RN, et al. Humoral immunity to aerosolized staphylococcal enterotoxin B (SEB), a superantigen, in monkeys vaccinated with SEB toxoid-containing microspheres. *Infect Immun* 1995; 63: 2880-2885.

104. O'Hagan DT, McGee JP, Holmgren J, et al. Biodegradable

microparticles for oral immunization. *Vaccine* 1993; 11: 149-154.

105. Eyles JE, Williamson ED, Spiers ID, Alpar HO. Protection studies following bronchopulmonary and intramuscular immunisation with *Yersinia pestis* F1 and V subunit vaccines coencapsulated in biodegradable microspheres: a comparison of efficacy. *Vaccine* 2000; 18: 3266-3271.

106. Singh M, Li XM, McGee JP, et al. Controlled release microparticles as a single dose hepatitis B vaccine: evaluation of immunogenicity in mice. *Vaccine* 1997; 15: 475-481.

107. Santiago N, Milstein S, Rivera T, et al. Oral immunization of rats with proteinoid microspheres encapsulating influenza virus antigens. *Pharm Res* 1993; 10: 1243-1247.

108. Moldoveanu Z, Novak M, Huang WQ, et al. Oral immunization with influenza virus in biodegradable microspheres. *J Infect Dis* 1993; 167: 84-90.

109. Marx PA, Compans RW, Gettie A, et al. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science* 1993; 260: 1323-1327.

110. Cleland JL, Lim A, Daugherty A, et al. Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1. Programmable in vivo autoboot and long lasting neutralizing response. *J Pharm Sci* 1998; 87: 1489-1495.

111. Ray R, Novak M, Duncan JD, Matsuoka Y, Compans RW. Microencapsulated human parainfluenza virus induces a protective immune response. *J Infect Dis* 1993; 167: 752-755.

112. Partidos CD, Vohra P, Jones DH, Farrar GH, Steward MW. Mucosal immunization with a measles virus CTL epitope encapsulated in

biodegradable PLG microparticles. *J Immunol Methods* 1996; 195: 135-138.

113. Ertl HCJ, Varga I, Xiang ZQ, et al. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres as carriers for peptide vaccines. *Vaccine* 1996; 14: 879-885.

114. Partidos CD, Shaw DM, Gander B, et al. Induction of antibody responses to a synthetic peptide entrapped in biodegradable microparticles. *Vaccine Res* 1994; 3: 203-209.

115. Thomasin C, Corradin G, Men Y, Merckle H, Gander B. Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen containing poly(lactide)/poly(lactide-co-glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response. *J Control Rel* 1996; 41: 131-145.

116. Honma K, Kato T, Okuda K. Salivary immunoglobulin A production against a synthetic oligopeptide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 288-292.

117. Elsaid MM, Vitor RW, Frezard FJ, Martins MS. Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 485-490.

118. Kim CK, Jeong EJ, Kim MH. Comparison of in vivo fate and immunogenicity of hepatitis B surface antigen incorporated in cationic and neutral liposomes. *J Microencapsulation* 2000; 17: 297-306.

119. Sospedra P, Alsina MA, Espina M, et al. Hepatitis A Synthetic Peptide VP3(110-121) Miscibility with Dipalmitoylphosphatidylcholine, Ditoylphosphatidylglycerol, and Stearylamine Monolayers. *J Colloid Interface Sci* 2000; 221: 230-235.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

120. Garcia M, Alsina MA, Reig F, Haro I. Liposomes as vehicles for the presentation of a synthetic peptide containing an epitope of hepatitis A virus Vaccine 1999; 18: 276-283.

121. Zhou WZ, Hoon DS, Huang SK, et al. RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. Hum Gene Ther 1999; 10: 2719-2724.

122. Kim SY, Doh HJ, Jang MH, et al. Oral immunization with Helicobacter pylori-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. Helicobacter 1999; 4: 33-39.

123. Lemoine D, Preat V. Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. J Control Rel 1998; 54: 15-27.

124. Gu XG, Schmitt M, Hiasa A, et al. A novel hydrophobized polysaccharide/oncoprotein complex vaccine induces in vitro and in vivo cellular and humoral immune responses against HER2-expressing murine sarcomas. Cancer Res 1998; 58: 3385-3390.

125. Frey A, Neutra MR, Robey FA. Peptomer aluminum oxide nanoparticle conjugates as systemic and mucosal vaccine candidates: synthesis and characterization of a conjugate derived from the C4 domain of HIV-1MN gp120. Bioconjug Chem 1997; 8: 424-433.

126. Ledley FD. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. Human Gene Ther 1995; 6: 1129-1144.

127. Rolland A, Tomlison, E. Controllable gene therapy using nonviral systems. In: Artificial self-assembly systems for gene delivery, 1996; 86-100.

128. Garcia-Chaumont C, Seksek, O, Grzybowski J, Borowski E, Bolard,

J. Delivery systems for antisense oligonucleotides. Pharmacol Therapeu 2000; 87: 255-277.

129. Lambert G, Fattal, E, Couvreur, P. Nanoparticulate system for the delivery of antisense oligonucleotides. Adv Drug Del Rev 2001; 47: 99-112.

130. Storm G, Crommelin, D.J.A. Liposomes: quo vadis? Pharm Sci Tech Today 1998; 1: 19-31.

131. Tunçay M, Çalis S, Kas HS, et al. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation. Int J Pharm 2000; 195: 179-188.

132. Leo E, Forni F, Bernabei MT. Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres. Int J Pharm 2000; 196: 1-9.

133. Gabor F, Ertl B, Wirth M, Mallinger R. Ketoprofen-poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. J Microencapsulation 1999; 16: 1-12.

134. Schartel B, Volland C, Li YX, Wendorff JW, Kissel T. Dielectric and thermodynamic properties of biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide) and the effect on the microencapsulation and release of captopril. J Microencapsulation 1997; 14: 475-488.

135. Benelli P, Conti B, Genta I, Constantini M, Montanari L. Clonazepam microencapsulation in poly-D,L-lactide-co-glycolide microspheres. J Microencapsulation 1998; 15: 431-443.

136. Bodmeier R, McGinity JW. The preparation and evaluation of drug-containing poly (dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. Pharm Res 1987; 4: 465-471.

137. Barrera P, Blom A, van Lent PL, et al. Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43: 1951-1059.

138. Behari JR, Nihal nMM. Galactosylated liposomes as carriers for targeting meso-2,3-dimercaptosuccinic acid to cadmium storage sites in cadmium exposed mice. Ind Health 2000; 38: 408-412.

139. van Slooten ML, Storm G, Zoephel A, et al. Liposomes containing interferon-gamma as adjuvant in tumor cell vaccines. Pharm Res 2000; 17: 42-48.

140. Valenta C, Wanka M, Heidlas J. Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. J Control Rel 2000; 63: 165-173.

141. Calpena AC, Escribano E, San Martin H, et al. Influence of the formulation on the in vitro transdermal penetration of sodium diclofenac. Evaluation of the topical and systemic anti-inflammatory activity in the rat. Arzneimittelforschung 1999; 49: 1012-1017.

142. Ponchel G, Irache J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. Adv Drug Del Rev 1998; 34: 191-219.

143. Schaertl S, Meyer-Almes FJ, López-Calle E, Siemers A, Kramer J. A novel and robust homogeneous fluorescence-based assay using nanoparticles for pharmaceutical screening and diagnostics. J Biomol Screen 2000; 5: 227-238.

144. Anderson SA, Rader RK, Westlin WF, et al. Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculation with alpha(v)beta(3)-targeted nanoparticles. Magn Reson Med 2000; 44: 433-439.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

145. Perrin A, Theretz A, Lanet V, Vialle S, Mandrand B. Immunomagnetic concentration of antigens and detection based on a scanning force microscopic immunoassay. *J Immunol Methods* 1999; 224: 77-87.

146. Truong-Le VL, Walsh SM, Schweibert E, et al. Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361: 47-56.

147. Ryu J, Jeong YI, Kim IS, et al. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles of poly(varepsilon-caprolactone)/poly(ethylene glycol)/

poly(varepsilon-caprolactone) triblock copolymers. *Int J Pharm* 2000; 200: 231-242.

148. Jennings V, Gysler A, Schafer-Korting M, Gohla SH. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 49: 211-218.

149. González-Martín G, Figueroa C, Merino I, Osuna A. Allopurinol encapsulated in polycyanoacrylate nanoparticles as potential lysosomal carrier: preparation and try-

panocidal activity. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 49: 137-142.

150. Calvo P, Alonso MJ, Vila-Jato JL, Robinson JR. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *J Pharm. Pharmacol* 1996; 48: 1147-1152.

151. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25: 471-476.